DOI:10.11931/guihaia.gxzw202405051

太子参 R2R3-MYB 转录因子鉴定及表达分析

黄以书， 何华， 周涛， 潘琪， 刘红霞， 徐娇， 欧小宏， 江维克*

（贵州中医药大学，贵阳 550025）

摘 要：R2R3-MYB 转录因子在植物的生长发育、逆境响应及次生代谢等过程具有重要的调控作用。为了探究太子参中 R2R3-MYB 转录因子的时空表达模式并筛选参与调控环肽 B 生物合成的 R2R3-MYB 转录因子，该文基于太子参的全长转录组数据库，从太子参中鉴定到 15 个 R2R3-MYB 转录因子，利用生物信息学方法对其理化性质、保守基序和系统进化进行分析，并运用 qRT-PCR 对其组织表达和激素脱落酸（abscisic acid，ABA）诱导的表达模式进行研究。结果表明：（1）15 个 PhR2R3-MYB 蛋白亚细胞定位于细胞核，大部分 PhR2R3-MYB 蛋白为不稳定性亲水蛋白。与拟南芥 R2R3-MYB 蛋白一同构建系统进化树，可将 PhR2R3-MYB 蛋白分为 8 个亚组，其中有 6 个亚组能分别与拟南芥 R2R3-MYB 转录因子聚类。（2）PhR2R3-*MYB* 基因在太子参植物中具有组织表达特异性，其中 2 个基因——*PhMYB*4 和 *PhMYB*8 在块根韧皮部中特异性高表达。相关性分析显示，*PhMYB*4 和 *PhMYB*8 基因表达量与太子参中环肽 B 含量及 *prePhHB* 基因表达量均呈显著正相关，推测 PhMYB4 和 PhMYB8 可能参与了太子参中环肽 B 的生物合成调控。（3）ABA 处理后，*PhMYB*4 基因呈现出先降低后升高的表达趋势，而 *PhMYB*8 基因的表达受到了抑制，表明 *PhMYB*4 和 *PhMYB*8 基因均响应 ABA 信号。该研究结果为后续探究 PhR2R3-*MYB* 基因的功能奠定了基础，也为研究 PhR2R3-MYB 转录因子调控环肽 B 生物合成的分子机制提供了理论依据。

关键词：太子参，R2R3-MYB 转录因子，环肽 B，生物信息学分析，表达分析

中图分类号：Q941　　　　**文献标识码：**A　　　　**文章编号：**空

Identification and expression analysis of R2R3-MYB transcription factor in *Pseudostellaria heterophylla*

HUANG Yishu, HE Hua, ZHOU Tao, PAN Qi, LIU Hongxia, XU Jiao,
OU Xiaohong, JIANG Weike*

(*Guizhou University of Traditional Chinese Medicine*, Guiyang 550025, China)

Abstract: R2R3-MYB transcription factor plays an important role in plant growth and development, stress response, and secondary metabolism. In order to explore the temporal and spatial expression pattern of R2R3-MYB transcription factors in *Pseudostellaria heterophylla* and screen R2R3-MYB transcription factors involved in the regulation of heterophyllin B biosynthesis, fifteen R2R3-MYB transcription factors were identified from *P. heterophylla* based on the full-length transcriptome database. Their physical and chemical properties, conserved motifs and phylogenetic relationships were analyzed by bioinformatics methods, and their tissue expression and abscisic acid induced expression patterns were studied by qRT-PCR. The results were as follows: (1) 15 PhR2R3-MYB proteins subcellular were predicted to locate in cell nucleus, and most of them were unstable hydrophilic proteins. By constructing phylogenetic tree with

---

基金项目：国家自然科学基金地区项目（82160728，82160716）；贵州省基础研究项目（黔科合基础-ZK[2022]一般464）；贵州省教育厅高校科研平台（黔教技[2022]021 号）。

第一作者：黄以书（1996—），硕士研究生，研究方向为中药及民族药资源分类鉴定与质量控制研究，（E-mail）1586575202@qq.com。

***通信作者：**江维克，硕士，教授，研究方向为中药资源学，（E-mail）jwk_88@ 163.com。

Arabidopsis R2R3-MYB protein, PhR2R3-MYB proteins can be divided into 8 subgroups, of which 6 subgroups can be clustered with *Arabidopsis* R2R3-MYB transcription factors respectively. (2) PhR2R3-*MYB* gene has tissue expression specificity in *P. heterophylla*, and two of the genes, *PhMYB*4 and *PhMYB*8, are highly expressed in phloem of tuberous root. Correlation analysis showed that *PhMYB*4 and *PhMYB*8 gene expression were significantly positively correlated with heterophyllin B content and *prePhHB* gene expression in *P. heterophylla*, suggesting that PhMYB4 and PhMYB8 might be involved in the regulation of heterophyllin B biosynthesis in *P. heterophylla*. (3) *PhMYB*4 and *PhMYB*8 gene were differentially expressed in response to ABA treatment for different time. The expression of *PhMYB*4 gene decreased first and then increased, while the expression of *PhMYB*8 gene was inhibited with ABA treatment, indicating that both *PhMYB*4 and *PhMYB*8 genes respond to ABA signals. This study will lay a foundation for further investigation of the function of PhR2R3-*MYB* gene, and also provides a theoretical basis for revealing the mechanism of R2R3-MYB transcription factor involved in the regulation of heterophyllin B biosynthesis.

Key words: *Pseudostellaria heterophylla*, R2R3-MYB transcription factor, heterophyllin B, bioinformatic analysis, qxpression analysis

太子参为石竹科植物孩儿参（*Pseudostellaria heterophylla*）的干燥块根，具有益气健脾、生津润肺的功效，临床上用于脾虚体倦、食欲不振、病后虚弱等病症。太子参主要的活性成分有环肽、皂苷、多糖等化学物质，现代药理研究认为环肽 B （heterophyllin B）具有促进血管新生、抗炎、抑制酪氨酸酶活性等作用，具有较高的药用开发价值（Yang et al., 2018；李军等，2019；Deng et al., 2022）。但是太子参中环肽 B 的含量并不高，限制了其开发利用。随着组学技术的发展，在解析太子参中环肽 B 生物合成途径的基础上，挖掘太子参中环肽 B 生物合成相关的调控因子并解析其调控机制是提高环肽 B 含量的有效手段。已有研究表明，环肽 B 是由线性前体肽经酶催化形成的环状化合物，其中 *prePhHB* 是环肽 B 的前体肽编码基因，是环肽 B 生物合成途径中的关键酶编码基因（Zheng et al., 2019）。虽然环肽 B 的生物合成途径在逐步解析，但是关于环肽 B 生物合成的调控研究还较少。现有研究显示，水分胁迫、氮代谢及植物激素 ABA 等均会影响环肽 B 的积累（许文彦，2011；韦德群，2019；刘洋等，2024），但关于环肽 B 生物合成的转录调控研究还未见报道。

转录因子(transcription factor，TF)是一类调节蛋白，通过直接或间接地与靶基因启动子区的顺式作用元件结合来调节靶基因的转录表达。MYB 转录因子是目前植物中功能多样、分布广泛的转录因子家族之一，可以调控植物的生长发育、次生代谢及逆境响应等过程（张弛等，2020；段童瑶等，2020）。根据 MYB 结构域的数目，可以将其分为 4 类：1R-MYB、R2R3-MYB、3R-MYB 和 4R-MYB（牛义岭等，2016）。研究表明 R2R3-MYB 转录因子在植物次生代谢的调控过程中发挥重要作用，如丹参 SmMYB98 可以通过激活丹参酮和丹酚酸生物合成通路上关键酶编码基因的表达来调控丹参酮和丹酚酸的生物合成（Hao et al., 2020），三七中的 PnMYB1 调控三七皂苷的生物合成（雷君等，2022），红豆杉中的 R2R3-MYB 转录因子——TcMYB29a 通过脱落酸介导的紫杉醇积累信号通路促进紫杉醇在红豆杉细胞中的积累（Cao et al., 2022）。已有研究表明，ABA 可以增加太子参组织培养丛生芽中环肽 B 的积累（许文彦，2011），但是关于 R2R3-MYB 转录因子是否调控太子参次级代谢产物环肽 B 的生物合成尚不清楚。

因此，本研究以太子参为研究材料，基于前期建立的太子参全长转录组数据库，拟对太子参中的 R2R3-MYB 转录因子成员进行鉴定，并对其蛋白理化性质、进化关系、保守基序、组织表达等特征进行分析。基于基因共表达分析的方法，通过太子参不同组织中 R2R3-*MYB* 基因的表达量与环肽 B 含量、*prePhHB* 基因表达量的相关性分析来筛选与太子参中环肽 B 生物合成调控相关的候选

R2R3-MYB 转录因子，并通过 qRT-PCR 分析其在 ABA 处理后的表达情况，为后续解析其调控太子参中环肽 B 生物合成的分子机制提供基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

太子参品种‘施太 1 号’（ST1）采自贵州省施秉县太子参种植基地，贵州中医药大学人工气候室育苗。收集 ST1 品种的不同组织——茎、叶、块根的韧皮部及木质部，一部分于液氮中速冻，用于总 RNA 的提取；一部分用于环肽 B 含量测定。

激素处理实验材料为 ST1 组培苗，待 ST1 组培苗形成块根后，在 MS 液体培养基中分别添加 10、20、50、100 μmol·L^{-1} 的 ABA 进行处理，添加等量无水乙醇为对照，23 ℃下光照培养，光照时间（明/暗）为 16 h / 8 h，每组设置 3 个重复。上述材料分别培养 3、5、7 d 后收集块根，烘干后进行环肽 B 含量检测。选择最适的 ABA 处理浓度，分别处理 ST1 组培苗 1、3、6、12 h，对照处理加等量无水乙醇，处理后收集块根，速冻于液氮中，用于总 RNA 提取。

1.2 仪器

台式冷冻离心机（5810R，德国 Eppendorf 公司）；核酸微量测定仪（Nanodrop 80-Touch，德国 Implen 公司）；实时荧光定量 PCR 仪（伯乐 CFX96 Real-Time System，美国）；凝胶成像系统（伯乐 ChemiDoc Touch，美国）；高效液相色谱仪（Waters e2695，美国 Waters 公司）。

1.3 试剂

Eastep® Super 总 RNA 提取试剂盒购于上海普洛麦格生物产品有限公司；PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 及 TB Green® premix Ex Taq™ II 试剂盒购自于宝日医生物技术有限公司；脱落酸（批号#D2110164，纯度≥90%）购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司；太子参环肽 B 对照品（批号 AFCB1705，纯度>95%）购自成都埃法生物科技有限公司。

1.4 研究方法

1.4.1 太子参 R2R3-MYB 家族鉴定及蛋白序列信息分析

在 Pfam（http://pfam.xfam.org）网站下载 MYB 转录因子的隐马尔可夫模型（PF00249），使用 HIMMER（v3.0）软件中的 hmmsearch 程序对太子参的蛋白序列进行搜索。以拟南芥的 MYB 蛋白序列作为种子文件，利用 BLAST（v2.2.8）中的 blastp 进行序列比对。综合 hmmsearch 与 blastp 2 种鉴定结果作为太子参 MYB 基因家族的侯选基因，并使用 SMART（http://smart.embl-heidelberg.de/）和 NCBI-CDD（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/ bwrpsb/bwrpsb.cgi）数据库对候选基因进行 MYB 保守结构域分析，根据 MYB 转录因子所含 MYB 结构域数目筛选获得 PhR2R3-MYB 转录因子，并对其进一步分析。

通过 Tbtools（v1.120）软件中 Protein Paramter Calc（ProtParam-based）对 15 个 PhR2R3-MYB 蛋白进行基本理化性质预测；利用在线网站 Bologna Unified Subcellular Component Annotator（http://busca.biocomp.unibo.it/）进行亚细胞定位预测。

1.4.2 太子参 R2R3-MYB 蛋白序列系统进化分析与分类

利用 MEGA 软件（v11.0）中的 Muscle 子程序对 15 条太子参和 126 条拟南芥的 R2R3-MYB 蛋白序列进行多重序列比对，邻域连接法（neighbor-joining，NJ）构建蛋白序列系统进化树，通过 bootstrap 检验（n=1 000）、Evolview 网站（https://www.evolgenius.info/）进行系统进化树分析。

1.4.3 太子参 R2R3-MYB 蛋白序列保守基序及特征结构域分析

利用 MEME（Multiple Expectation Maximization for Motif Elicitation）在线分析软件（http://meme-suite. org/）对 PhR2R3-MYB 转录因子的保守基序进行分析。参数为：基序长度范围 6～50 个氨基酸残基，基序最大发现数目 5 个，Tbtools 软件对分析结果进行可视化。通过 Jalview（v2.11）进行 PhR2R3-MYB 蛋白序列特征结构域展示、WebLogo（http://weblgo.Three-plusone.com/）绘制 R2 和 R3 特征结构域的序列标识。

1.4.4 太子参环肽 B 含量测定

参照文献（刘洋等，2024）对太子参不同组织（块根韧皮部、块根木质部、茎、叶）及 ABA 处理后的太子参样品的块根进行环肽 B 含量测定。

1.4.5 太子参 PhR2R3-*MYB* 及 *prePhHB* 基因的表达分析

通过转录组数据库获得基因序列，Primer 5（v.5.0）设计引物（表 1）。提取总 RNA，反转录成 cDNA，*Phactin*1 作为内参基因（Qin et al., 2017）。PCR 反应体系：cDNA 4 μL，TB Green® premix Ex Taq™Ⅱ 5 μL，Primer-F 0.4 μL，Primer-R 0.4 μL，ddH_2O 0.2 μL。反应条件按照 TB Green® premix Ex Taq™Ⅱ试剂盒说明书，每组设置 3 次生物学重复，采用 $2^{-\Delta Ct}$ 方法计算不同组织中基因的表达量，使用 TBtools 对基因表达量进行均一化处理，聚类热图分析；采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 ABA 处理下基因的相对表达量，利用 SPSS 27 软件中单因素方差分析进行显著性差异统计（*P<0.05；**P<0.01；***P<0.001），并使用 GraphPad Prism 9 软件进行作图。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Sequence of primers for real-time PCR

基因 Gene	上游引物序列（5'-3'） Upstream primer sequence（5'-3'）	下游引物序列（5'-3'） Downstream primer sequences（5'-3'）
*Phactin*1	CTGTATTTACGCTCAGGTGG	CATTGTGCTCAGTGGTGG
*PhMYB*1	GCTACTTCAGCTTCAATGCCC	TCGGCAAATTTTGTCCCTGC
*PhMYB*2	GCAATGAGGGCGTTCAATCA	TTGATCGCTAGCGGCATGAG
*PhMYB*3	AGTGCCCAGATTTGAACCTTGA	GCCCCAAACTACAAGTGAAGC
*PhMYB*4	AAACCGGAACACCAACCAGC	GGCTAGCATCAGTAGAAGCCG
*PhMYB*5	CTCAAGCCATTGGAGGAGCA	CCGAACCCATATGAGGCGAT
*PhMYB*6	CACCACTGCTAACGTGACTG	CGTCCGTGAGCGTTGAAAAC
*PhMYB*7	CGTCCACCTCCACCTCTACA	GTAACCGGGCTATGTTCCCG
*PhMYB*8	CCGGAGCTAGCATTACTCGG	GGTTCAGGAGTCTGGTTCGG
*PhMYB*9	AGAACAGGTGTCTGTCGCTC	TTAAATGGCACTGGCGGTGT
*PhMYB*10	GATGTTACCGTGGGTCAGTGT	CCCATCACCTGTTGGCCTAT
*PhMYB*11	ATGGCAAGGGTGATTGGAGG	GTCGACTGTGGTGATGTCGT
*PhMYB*12	ACAACGACATTGCTCGTGAC	CATGGACATTTCTGCCCTCCT
*PhMYB*13	TGCTAGGCTACTTAACGGTCG	GAAGGACTTTCCGGCGATGA
*PhMYB*14	TGCTAGCATGACCAATGCGG	TTTCAAAGCCTGCACAAGGG
*PhMYB*15	TCATGGTGAGTTCGGACAGC	GCATCTCCCTCTAACACGGG
prePhHB	GAAGCCGAGTATTTTTGGGGGTC	GCATTACAATGCATACTTACACCATGA

1.4.6 PhR2R3-*MYB* 基因与太子参环肽 B 合成的相关性分析

将 15 个 PhR2R3-*MYB* 基因在太子参不同组织中的表达量与其所对应的环肽 B 的含量合并整理，利用 SPSS 27 软件中的皮尔森相关系数进行相关性分析（*P<0.05；**P<0.01；***P<0.001），使用 Origin 2021 绘制相关性热图。将 PhR2R3-*MYB* 的表达量与太子参环肽 B 合成的线性前体肽编码基因——*prePhHB* 的表达量进行皮尔森相关系数分析。

2 结果与分析

2.1 太子参 R2R3-MYB 转录因子鉴定及蛋白理化性质分析

通过验证、筛选，去掉结构不完整和重复的序列，鉴定到 15 个具有完整 ORF 序列的 PhR2R3-MYB 转录因子，命名为 PhMYB1～15（表 2）。分析结果显示（表 2），PhR2R3-MYB 蛋白编码的氨基酸长度为 221～1 012 个氨基酸残基，蛋白相对分子质量为 24 476.36～114 335.74 Da，蛋白等电点小于 7 的成员有 8 个，蛋白等电点大于 7 的成员有 7 个，表明不同 PhR2R3-MYB 蛋白的生物学功能存在差异；脂溶指数均小于 100，亲疏水性系数均为负值，不稳定指数大于 40 的蛋白有 14 个，表明 PhR2R3-MYB 蛋白多为亲水性不稳定蛋白。BUSCA 亚细胞定位预测结果显示，均定位于细胞核中，具有典型的转录因子特征，在细胞核内发挥功能。

表 2 PhR2R3-MYB 蛋白基本信息及理化性质预测

Table 2 Basic information and physicochemical properties prediction of PhR2R3-MYB protein in

Pseudostellaria heterophylla

基因 Gene	氨基酸数 Amino acid number	相对分子量 Relative molecular mass(Da)	不稳定数 Instability index	脂溶数 Aliphatic index	亲疏水性 Hydrophilic and hydrophobic	等电点 pI	亚细胞定位 Subcellular localization
*PhMYB*1	313	35 331.15	41.11	57.99	-0.854	6.16	细胞核 Cell nucleus
*PhMYB*2	450	50 982.49	56.61	73.89	-0.668	7.21	细胞核 Cell nucleus
*PhMYB*3	274	30 993.10	31.05	76.57	-0.707	8.82	细胞核 Cell nucleus
*PhMYB*4	320	36 665.63	69.5	65.91	-0.778	4.94	细胞核 Cell nucleus
*PhMYB*5	297	32 575.70	49.64	68.32	-0.63	8.59	细胞核 Cell nucleus
*PhMYB*6	268	30 940.00	54.94	72.72	-0.687	8.72	细胞核 Cell nucleus
*PhMYB*7	341	38 229.47	57.05	66.1	-0.858	6.47	细胞核 Cell nucleus
*PhMYB*8	267	29 055.66	44.86	63.6	-0.654	9.15	细胞核 Cell nucleus
*PhMYB*9	287	31 414.25	47.29	68.64	-0.619	6.96	细胞核 Cell nucleus
*PhMYB*10	279	32 218.31	49.52	70.18	-0.89	8.86	细胞核 Cell nucleus
*PhMYB*11	250	27 521.33	49.06	56.92	-0.837	6.01	细胞核 Cell nucleus
*PhMYB*12	286	32 418.63	55.44	61.4	-0.892	5.3	细胞核 Cell nucleus
*PhMYB*13	221	24 476.36	55.14	63.48	-0.752	6.87	细胞核 Cell nucleus
*PhMYB*14	667	75 872.44	55.89	65.13	-0.93	8.51	细胞核 Cell nucleus
*PhMYB*15	1012	114 335.74	49.77	73.99	-0.904	5.19	细胞核 Cell nucleus

2.2 PhR2R3-MYB 蛋白保守基序与特征结构域分析

分析 15 个太子参 PhR2R3-MYB 蛋白的保守基序，鉴定到 5 个保守基序（图 1），大多数 PhR2R3-MYB 家族成员都包含 motif 1、motif 2 和 motif 4 这三个高度保守的基序，表明 PhR2R3-MYB 家族基序保守性强，且大多位于蛋白序列 N 端；而所有成员都含有 motif 2 基序，这是识别 R2R3-MYB 蛋白的重要标志。结合系统进化分析发现，同一 PhR2R3-MYB 亚家族具有相似的 motif 种类与分布，不同亚家族在种类与分布上具有较大差异。进一步对上述 15 个蛋白的 R2R3-MYB 结构域进行多重序列比对，结果显示（图 2），所有蛋白成员都具有 MYB 结构域的重要特征，即每个 MYB 重复片段中都间隔 1 个色氨酸残基（W）。除了保守的色氨酸残基外，R2 特征结构域中也有其他保守的氨基酸残基，如甘氨酸（G）、谷氨酸（E）、天冬氨酸（D）；R3 特征结构域中也有甘氨酸（G）、谷氨酸（E）、天冬氨酸（D）、异亮氨酸（I）、赖氨酸（K）等保守氨基酸残基。

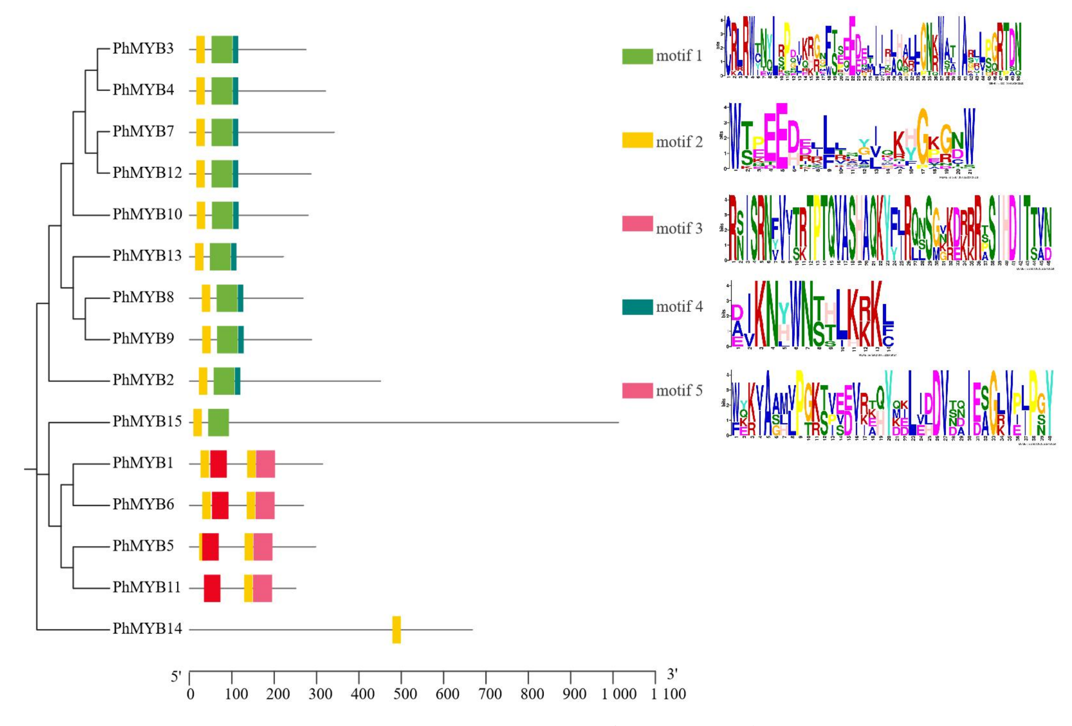


图 1 PhR2R3-MYB 蛋白保守基序分析

Fig. 1 Conserved motif analysis of PhR2R3-MYB protein

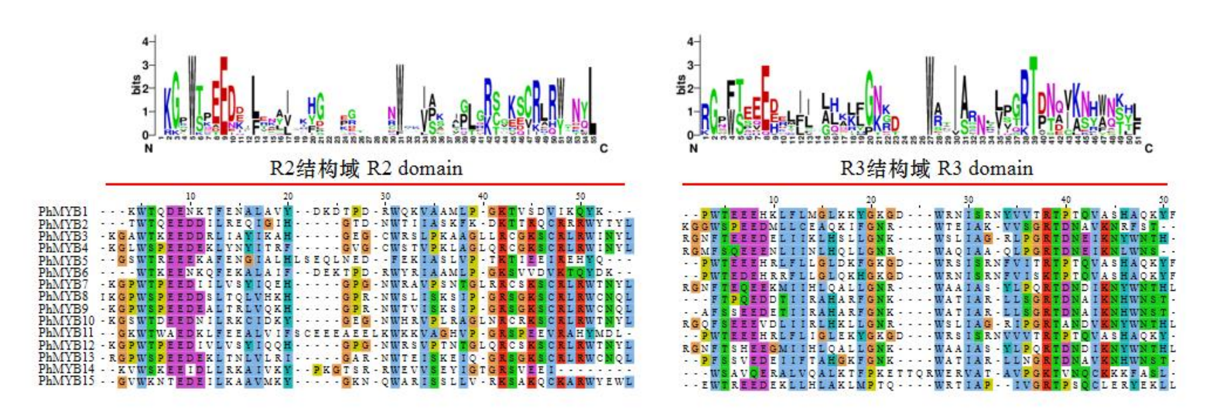


图 2 PhR2R3-MYB 蛋白特征结构域标识

Fig. 2 PhR2R3-MYB protein characteristic domain identification

2.3 太子参 PhR2R3-MYB 转录因子的系统进化分析

利用鉴定的 PhR2R3-MYB 蛋白与 126 个拟南芥 R2R3-MYB 蛋白构建系统进化树（图 3）。结合拟南芥 R2R3-MYB 蛋白亚组的分类（Dubos et al., 2010），将 15 个 PhR2R3-MYB 转录因子分为 8 个亚组（C1～C8），其中 6 个亚组能与拟南芥已分类亚组聚类，包括 C1（S1）、C2（S13）、C3（S4）、C4（S6）、C5（S22）及 C6（S25）；C7 及 C8 亚组的 5 个成员不与拟南芥 R2R3-MYB 成员聚类，单独聚成一个亚组。拟南芥中的 S1、S22 亚组蛋白主要参与植物的逆境响应及激素信号转导等过程（Chen et al., 2006；樊锦涛等，2014）；拟南芥中的 S4、S6 亚组蛋白参与植物花青素等次级代谢产物生物合成的调控过程（Zhang et al., 2023）。系统进化分析表明，太子参中的大多数 R2R3-MYB 成员与上述拟南芥 R2R3-MYB 成员同源性较高，提示具有相似的功能；未与拟南芥 R2R3-MYB 成员聚类的 C7 及 C8 亚组成员可能发生了功能的分化。

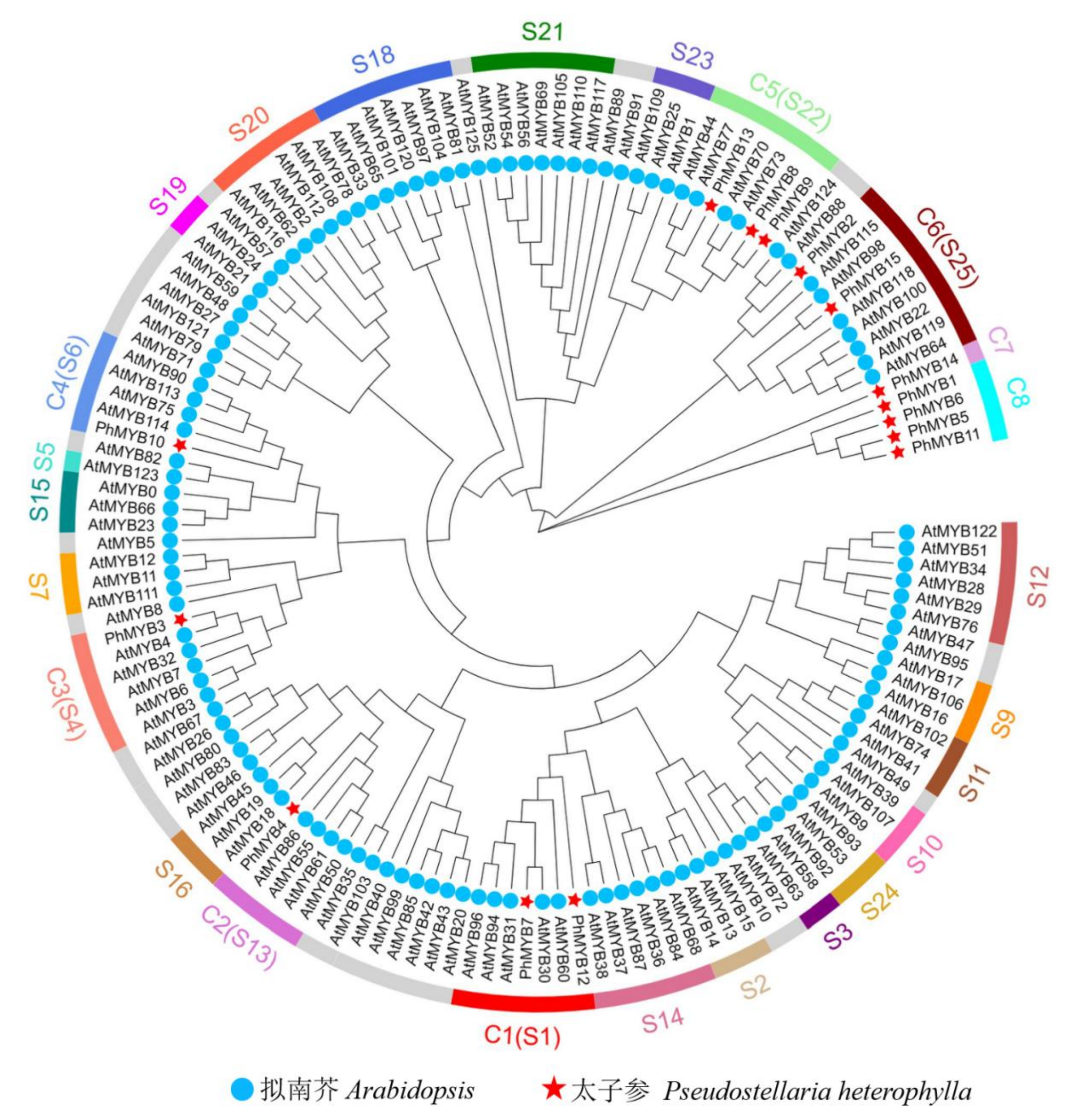


图 3 太子参和拟南芥 R2R3-MYB 转录因子家族系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of the R2R3-MYB transcription factor family in *Pseudostellaria heterophylla* and *Arabidopsis*

2.4 太子参中 R2R3-*MYB* 基因的组织表达分析

利用 qRT-PCR 对 PhR2R3-*MYB* 基因在太子参块根韧皮部、块根木质部、茎和叶 4 个不同组织的表达特征进行了检测。结果显示（图 4），*PhMYB*4 和 *PhMYB*8 在太子参块根韧皮部中特异性表达；*PhMYB*9 和 *PhMYB*13 在太子参块根木质部中表达量较高；*PhMYB*1、*PhMYB*2、*PhMYB*3、*PhMYB*5、*PhMYB*6 和 *PhMYB*10 在太子参茎中表达量较高；*PhMYB*7、*PhMYB*11、*PhMYB*12、*PhMYB*14 和 *PhMYB*15 在太子参叶中表达量较高。以上结果表明 PhR2R3-*MYB* 基因具有明显的组织表达特异性，可能在太子参不同组织中发挥特异的功能。

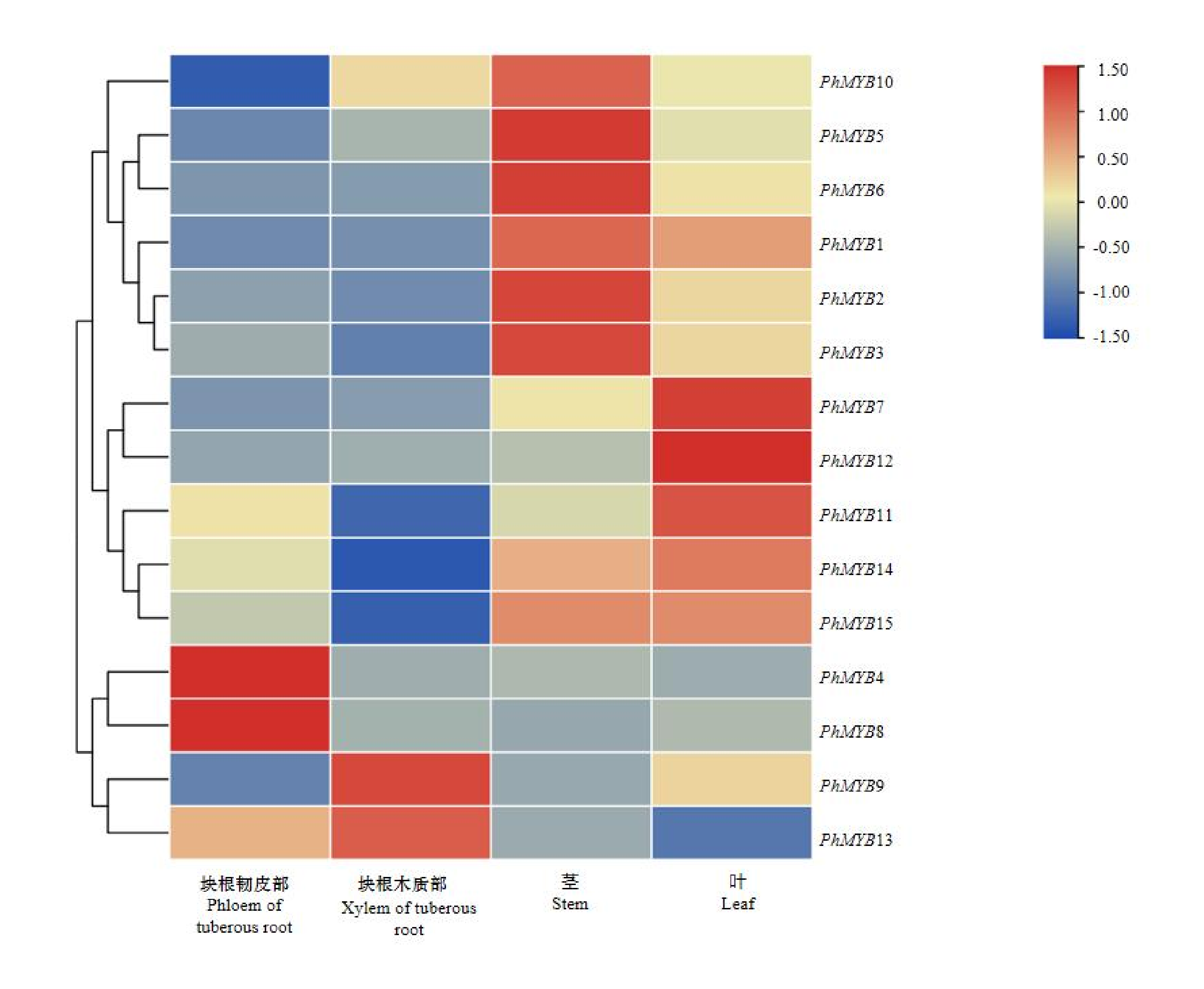
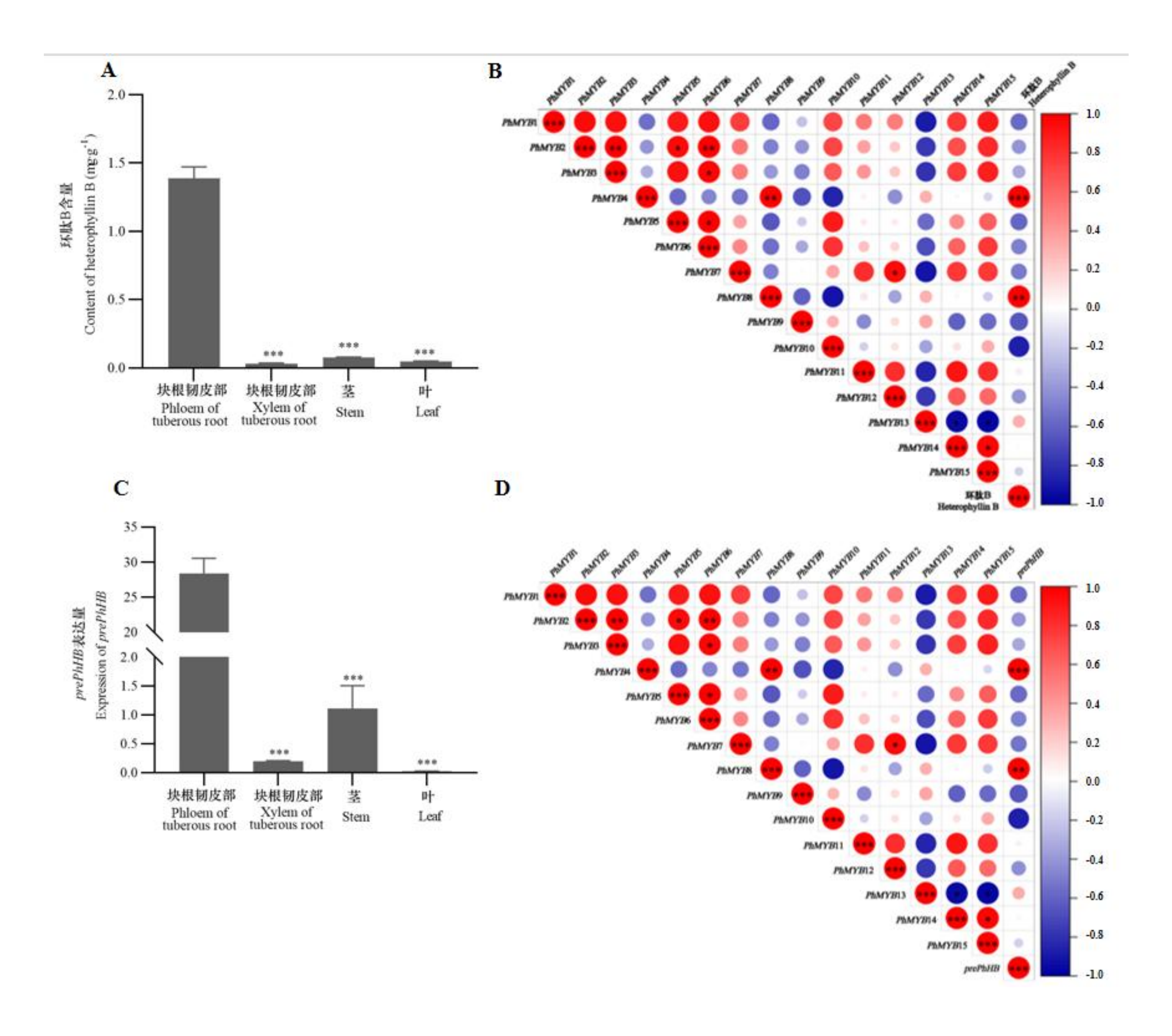


图 4 PhR2R3-*MYB* 基因在太子参不同组织中的表达量分析

Fig. 4 Expression analysis of PhR2R3-*MYB* genes in different tissues of *Pseudostellaria heterophylla*

2.5 太子参中 R2R3-*MYB* 基因表达量与环肽 B 含量及 *prePhHB* 基因表达量的相关性分析

为了挖掘与环肽 B 生物合成相关的 R2R3-MYB 转录因子，利用 HPLC 检测太子参对应组织（块根韧皮部、块根木质部、茎、叶）中环肽 B 的含量。结果显示（图 5：A），块根韧皮部环肽 B 的含量显著高于其它组织。通过将 PhR2R3-*MYB* 基因表达量与环肽 B 含量进行相关性分析（图 5：B），结果表明与太子参中环肽 B 含量呈显著相关的基因为 *PhMYB*4 和 *PhMYB*8，且为高度正相关，提示 PhMYB4 和 PhMYB8 转录因子可能参与了太子参中环肽 B 的生物合成调控。qRT-PCR 检测太子参对应组织中 *prePhHB* 基因的表达量，结果显示（图 5：C），块根韧皮部 *prePhHB* 基因的表达量显著高于其他组织，相关性分析结果表明（图 5：D），*PhMYB*4 和 *PhMYB*8 基因表达量与 *prePhHB* 基因表达量呈显著正相关。这一结果进一步表明 PhMYB4 和 PhMYB8 转录因子可能参与了太子参中环肽 B 的生物合成调控。



A. 太子参不同组织中环肽 B 含量；**B.** PhR2R3-*MYB* 基因表达量与环肽 B 含量相关性分析；**C.** 太子参不同组织中 *prePhHB* 基因表达量分析；**D.** PhR2R3-*MYB* 基因表达量与 *prePhHB* 基因表达量相关性分析。*、**、***分别表示在 P<0.05、P<0.01、P<0.001 水平的相关性分析的显著性，下同。

A. Content of heterophyllin B in different tissues of *Pseudostellaria heterophylla*p; **B.** Correlation analysis between PhR2R3-*MYB* gene expression and heterophyllin B content; **C.** Expression analysis of *prePhHB* gene in different tissues of *Pseudostellaria heterophylla*; **D.** Correlation analysis between PhR2R3-*MYB* gene expression and *prePhHB* gene expression. *, **, *** indicate significance of correlation analysis at the levels of P<0.05, P<0.01, P<0.001, respectively，the same below.

图 5 PhR2R3-*MYB* 基因表达量与环肽 B 含量及 *prePhHB* 基因表达量的相关性分析

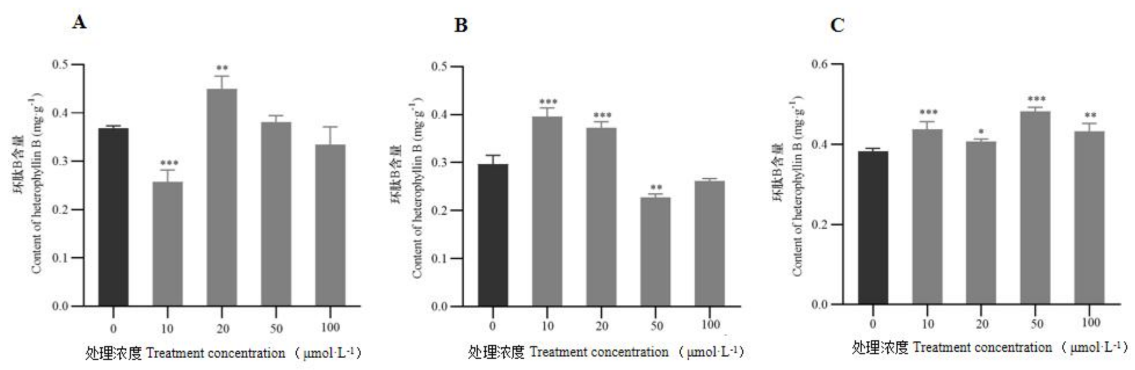
Fig. 5 Correlation analysis between the expression of PhR2R3-*MYB* gene and the content of heterophyllin B and *prePhHB* gene expression.

2.6 ABA 诱导 PhR2R3-*MYB* 基因的表达分析

ABA 作为调控植物生长发育及逆境响应过程的重要植物激素之一，可以通过信号转导及激素互作等作用来调控植物次级代谢产物的合成。本实验通过使用不同浓度的外源 ABA 处理太子参组培苗，检测处理不同时间后太子参组培苗块根中的环肽 B 含量，结果显示（图 6），不同浓度的 ABA 处理对太子参块根中环肽 B 累积的影响存在差异。当用不同浓度的 ABA 处理太子参 3 d 后，20 μmol·L^{-1} ABA 处理能显著提高太子参块根中环肽 B 的累积，相比对照提高了 20.33%。当用不同浓度的 ABA 处理太子参 5 d 时，10 μmol·L^{-1} 及 20 μmol·L^{-1} ABA 处理的太子参块根中环肽 B 含量相比

对照都显著升高，分别比对照提高了 33.25%、25.61%；但用高浓度的 ABA 处理(50 μmol·L^{-1} 及 100 μmol·L^{-1})，环肽 B 含量则相比对照低。当用不同浓度的 ABA 处理太子参 7 d 时，不同处理浓度的 ABA 都能显著提高太子参块根中环肽 B 含量，分别相比对照提高了 14.54%、6.56%、26.21%和 13.20%。上述结果表明，使用 20 μmol·L^{-1} ABA 处理太子参不同时间（3、5、7 d），均能显著提高太子参块根中环肽 B 含量。

为了分析 *PhMYB*4 和 *PhMYB*8 基因是否响应外源 ABA 的诱导，本文通过 qRT-PCR 检测了这两个基因在外源 ABA 分别处理 1、3、6、12 h 后的表达模式。结果显示（图 7），ABA 处理后 *PhMYB*4 基因呈现出先降低后升高的表达趋势，且在 ABA 处理 6 h 时表达量最高。而 *PhMYB*8 基因在 ABA 处理后表达受到了抑制。上述结果表明，*PhMYB*4 和 *PhMYB*8 均受 ABA 诱导表达，但表达模式存在差异。



A-**C** 分别为外源不同浓度 ABA 处理太子参 3、5、7 d 后块根中环肽 B 含量。

A-**C** Represent the content of heterophyllin B in the tuberous root of *Pseudostellaria heterophylla* treated with exogenous ABA at different concentrations for 3, 5, 7 d, respectively.

图 6 外源 ABA 处理对太子参环肽 B 含量的影响

Fig.6 Effects of exogenous ABA treatment on the content of heterophyllin B in *Pseudostellaria heterophylla*

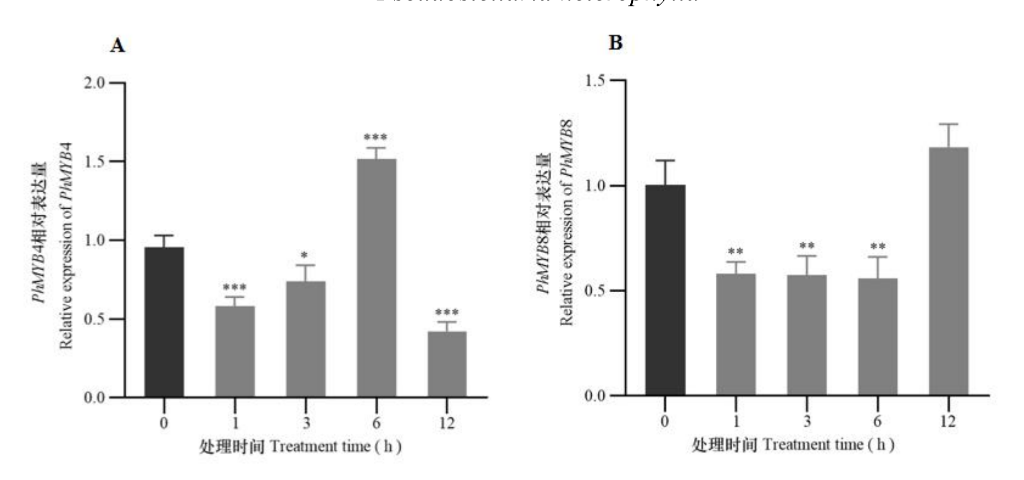


图 7 20 μmol·L^{-1} ABA 处理后 PhR2R3-*MYB* 基因的表达分析

Fig. 7 Expression analysis of PhR2R3-*MYB* gene after 20 μmol·L^{-1} ABA treatment

3 讨论与结论

该文基于太子参的全长转录组数据库，通过生物信息学方法鉴定了 15 个 R2R3-MYB 转录因子，并对其理化性质、保守基序、特征结构域及系统进化等进行了分析。理化性质分析显示，PhR2R3-

MYB 蛋白多为亲水性不稳定蛋白，这与吴瑞等（2022）研究结果一致。亚细胞定位结果显示，PhR2R3-MYB 蛋白均定位于细胞核，这与孙爽等（2022）研究结果一致，表明 PhR2R3-*MYB* 基因主要在细胞核内发挥功能。对 PhR2R3-MYB 蛋白的特征结构域进行分析，结果显示其蛋白序列中均具有“-W-（X19）-W-（X18）-W-”和“-F/W-（X18）-W-（X18）-W-”2 个相邻的 MYB 结构域，这与其他报道一致（Gonzalez et al., 2008；叶子茂等，2023），表明太子参与其他植物的 R2R3-MYB 转录因子在 DNA 结合域上具有较高的保守性。系统进化分析显示，太子参 R2R3-MYB 蛋白可以分为 8 个亚家族（C1~C8），其中有 6 个亚家族成员与拟南芥中的 R2R3-MYB 转录因子有共同聚类。研究表明拟南芥中的 S1、S22 亚组蛋白参与植物的逆境响应及 ABA 激素信号转导等过程（Cominelli et al., 2005；樊锦涛等，2014），而太子参中的 PhMYB7、PhMYB8、PhMYB9、PhMYB12 及 PhMYB13 转录因子与之有共同聚类，可能也在太子参逆境响应过程中发挥功能。

基因共表达分析是挖掘植物中与特定次级代谢产物生物合成相关的未知基因（包括转录因子编码基因）的有效策略，Zhang 等（2020）通过此方法鉴定了茶树中与茶氨酸生物合成相关的 MYB 转录因子。基于此，本文通过 qRT-PCR 技术对上述鉴定到的 15 个 R2R3-*MYB* 基因进行了组织表达分析，结果发现其中的两个基因——*PhMYB*4 和 *PhMYB*8 在太子参块根韧皮部中特异性表达。随后通过检测太子参不同组织中环肽 B 的含量，发现环肽 B 也主要在块根韧皮部中积累，与 Zheng 等（2019）报道结果一致。进一步对 PhR2R3-*MYB* 基因的表达量与环肽 B 含量、*prePhHB* 基因的表达量进行相关性分析，结果显示 *PhMYB*4 和 *PhMYB*8 基因表达量与环肽 B 含量、*prePhHB* 基因表达量均呈显著正相关，推测 *PhMYB*4 和 *PhMYB*8 基因参与太子参中环肽 B 的合成调控。

ABA 作为一种与环境因子变化密切联系的植物激素，也对次生代谢产物的合成积累具有调控作用（甄梦缘等，2024）。本研究结果表明，外源添加 ABA 也能促进太子参块根中环肽 B 的积累，与许文彦（2011）在太子参组织培养丛生芽中检测得到的结果一致。通过检测 *PhMYB*4 和 *PhMYB*8 基因响应 ABA 处理的表达模式，结果显示 *PhMYB*4 和 *PhMYB*8 基因响应 ABA 信号，但二者表达模式存在差异。系统进化显示，*PhMYB*8 基因与拟南芥 R2R3-MYB 家族第 22 亚族的成员同源性较高，而拟南芥 R2R3-MYB 家族第 22 亚族的成员也能响应 ABA 信号（Chen et al., 2006；樊锦涛等，2014），为后续解析 *PhMYB*4 和 *PhMYB*8 基因参与太子参中环肽 B 的合成调控机制提供了思路。

综上，本文对太子参中 R2R3-MYB 转录因子家族成员进行了系统分析和鉴定，筛选出可能调控太子参中环肽 B 生物合成的候选 MYB 转录因子——PhMYB4 及 PhMYB8，为通过基因工程等技术手段提高太子参中的药效成分含量提供了目标基因，也为解析太子参中药效成分合成调控的分子机制提供了前期基础。

参考文献

COMINELLI E, GALBIATI M, VAVASSEUR A, et al., 2005. A guard-cell-specific MYB transcription factor regulates stomatal movements and plant drought tolerance[J]. Current Biology, 15(13): 1196-1200.

CHEN YH, YANG XY, HE K, et al., 2006. The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family[J]. Plant Molecular Biology, 60(1): 107-124.

CAO XY, XU LX, LI L, et al., 2022. TcMYB29a, an ABA-responsive R2R3-MYB transcriptional factor, upregulates taxol biosynthesis in *Taxus chinensis*[J]. Frontiers in Plant Science, 13:804593.

DUBOS C, STRACKE R, GROTEWOLD E, et al., 2010. MYB transcription factors in *Arabidopsis*[J]. Trends in Plant Science, 15(10): 573-581.

DUAN TY, HUANG LY, WANG L, et al., 2020. Research progress of MYB transcription factors in the field of secondary metabolism of medicinal plants[J]. Molecular Plant Breeding, 18(2): 425-432. [段童瑶，黄璐瑶，王磊，等，2020. MYB 转录因子在药用植物次生代谢领域的研究进展[J]. 分子植物育种，

18(2)：425-432.]

DENG JH, FENG XY, ZHOU LJ, et al., 2022. Heterophyllin B, a cyclopeptide from *Pseudostellaria heterophylla*, improves memory via immunomodulation and neurite regeneration in i.c.v. Aβ-induced mice[J]. Food Research International, 158: 111576.

FAN JT, JIANG CQ, XING JH, et al., 2014. Structure and function of the 22nd subfamily in *Arabidopsis* R2R3-MYB family[J]. Hereditas (Beijing), 36(10): 985-994. [樊锦涛，蒋琛茜，邢继红，等，2014. 拟南芥 R2R3-MYB 家族第 22 亚族的结构与功能[J]. 遗传，36(10)：985-994.]

GONZALEZ A, ZHAO M, LEAVITT JM, et al., 2008. Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings[J]. Plant Journal, 53(5): 814-827.

HAO XL, PU ZQ, CAO G, et al., 2020. Tanshinone and salvianolic acid biosynthesis are regulated by *SmMYB*98 in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots[J]. Journal of Advanced Research, 23: 1-12.

Li J, ZHOU T, ZHENG W, et al., 2019. Analysis of tyrosinase inhibitory activity of different extracts and heterophyllin B from *Pseudostellaria heterophylla*[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 30(5): 1100-1102. [李军，周涛，郑伟，等，2019. 太子参不同提取物及环肽 HB 对酪氨酸酶抑制活性的分析[J]. 时珍国医国药，30(5)：1100-1102.]

LEI J, CHEN Q, DENG B, et al., 2022. Biosynthesis of *Panax notoginseng* saponins regulated by R2R3-MYB transcription factor PnMYB1[J]. Biotechnology Bulletin, 38(5): 74-83. [雷君，陈勤，邓兵，等，2022. R2R3-MYB 转录因子 PnMYB1 调控三七皂苷生物合成[J]. 生物技术通报，38(5)：74-83.]

LIU Y, OU XH, HU YP, et al., 2024. Effects of nitrate on the growth and heterophyllin B of *Pseudostellaria heterophylla* [J]. Northern Horticulture, (7): 104-111 [刘洋，欧小宏，胡艺镨，等，2024. 硝态氮对太子参生长与环肽 B 含量的影响[J]. 北方园艺，(7)：104-111.]

NIU YL, JIANG XM, XU XY, et al., 2016. Reaserch advances on transcription factor MYB gene family in Plant[J]. Molecular Plant Breeding, 14(8): 2050-2059. [牛义岭，姜秀明，许向阳，2016. 植物转录因子 MYB 基因家族的研究进展[J]. 分子植物育种，14(8)：2050-2059.]

QIN XJ, WU HM, CHEN J, et al., 2017. Transcriptome analysis of *Pseudostellaria heterophylla* in response to the infection of pathogenic *Fusarium oxysporum*[J]. BMC Plant Biology, 17(1): 155.

SUN S, HU Y, LU JY, et al., 2022. Characteristics, evolutionary and expression analysis of *R2R3-MYB* genes in *Pinus massoniana*[J]. Guihaia, 42(4): 580-594. [孙爽，胡颖，陆晶宇，等，2022. 马尾松 R2R3-*MYB* 基因特征及进化和表达分析[J]. 广西植物，42(4)：580-594.]

WEI DQ, 2019. Study on the response mechanism of *Pseudostellaria heterophylla* under water stress[D]. Guiyang: Guizhou University of Traditional Chinese Medicine: 1-106. [韦德群，2019. 水分胁迫下太子参的响应机制研究[D]. 贵阳：贵州中医药大学：1-106.]

WU R, LIN D, LUO D, et al., 2022. Identification and spatiotemporal expression analysis of R2R3-MYB transcription factor in *Crocus sativus*[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 30(3): 457-472. [吴瑞，林定，罗栋，等，2022. 番红花 R2R3-MYB 转录因子的鉴定与时空表达分析[J]. 农业生物技术学报，30(3)：457-472.]

XU WY, 2011. Biosynthetic pathway of heterophyllin B and mechanisms of fumonisins resistance[D]. Beijing: Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences: 1-133. [许文彦，2011. 太子参环肽 B 生物合成及伏马菌素抗性机制初探[D]. 北京：中国科学院昆明植物研究所：1-133.]

YANG CJ, YOU LT, YIN XB, et al., 2018. Heterophyllin B ameliorates lipopolysaccharide-induced inflammation and oxidative stress in RAW 264.7 macrophages by suppressing the PI3K/Akt pathways[J]. Molecules, 23(4): 717.

YE ZM, SHEN WX, LIU MY, et al., 2023. Effect of R2R3-MYB transcription factor CitMYB21 on

flavonoids biosynthesis in Citrus[J]. Acta Horticulturae Sinica, 50(2): 250-264. [叶子茂，申晚霞，刘梦雨，等，2023. R2R3-MYB 转录因子 CitMYB21 对柑橘类黄酮生物合成的影响[J]. 园艺学报，50(2)：250-264.]

ZHENG W, ZHOU T, LI J, et al., 2019. The biosynthesis of heterophyllin B in *Pseudostellaria heterophylla* from *prePhHB*-encoded precursor[J]. Frontiers in Plant Science, 10: 1259.

ZHANG C, WANG YF, CHEN J, et al., 2020. Research advances on the regulation of secondary metabolism by plant MYB transcription factors[J]. Genomics and Applied Biology, 39(9): 4171-4177. [张驰，王艳芳，陈静，等，2020. 植物 MYB 转录因子调控次生代谢的研究进展[J]. 基因组学与应用生物学，39(9)：4171-4177.]

ZHANG SH, CHEN Y, HE XL, et al., 2020. Identification of *MYB* transcription factors regulating theanine biosynthesis in tea plant using omics-based gene coexpression analysis[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 68(3): 918-926.

ZHANG LZ, DUAN ZD, MA S, et al., 2023. SlMYB7, an AtMYB4-Like R2R3-MYB transcription factor, inhibits anthocyanin accumulation in *Solanum lycopersicum* fruits[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 71(48):18758-18768.

ZHEN MY, WANG LZ, SUN C, et al., 2024. Progress in abscisic acid and its regulation of biosynthesis of secondary metabolites in plants[J]. Journal of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, 43(3): 259-267. [甄梦缘，王丽芝，孙超，2024. 脱落酸及其调控植物次生代谢产物生物合成的研究进展[J]. 天津中医药大学学报，43(3)：259-267.]